



COPY OF PAPERS  
ORIGINALLY FILED

1646

PATENT

ATTORNEY DOCKET NUMBER: 50125/020002

Certificate of Mailing: Date of Deposit: April 16, 2002

I hereby certify under 37 C.F.R. § 1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as **first class mail** with sufficient postage on the date indicated above and is addressed to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Guy E. Beardsley

Printed name of person mailing correspondence

Signature of person mailing correspondence

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

RECEIVED

APR 26 2002

Applicant: Stefan Kochanek et al.

Art Unit:

Serial No.: 10/079,609

Examiner:

Filed: February 21, 2002

Customer No.: 21559

Title:

PIGMENT EPITHELIAL CELL OF THE EYE, ITS PRODUCTION  
AND USE IN THERAPY OF AN EYE OR CNS DISEASE

TECH CENTER 1600/2900

Assistant Commissioner For Patents  
Washington, D.C. 20231

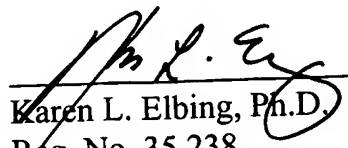
COPY OF PAPERS  
ORIGINALLY FILED

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS

In connection with the above-referenced application, applicants submit herewith priority documents, DE 101 08 412.9 (which was filed on February 21, 2001) and 60/270,746 (which was filed on February 22, 2001). Applicants petition for any necessary extensions of time for submission of this document. In addition, if there are any charges, or any credits, please apply them to Deposit Account No. 03-2095.

Respectfully submitted,

Date: 16 April 2002

  
Karen L. Elbing, Ph.D.  
Reg. No. 35,238

Clark & Elbing LLP  
101 Federal Street  
Boston, MA 02110  
Telephone: 617-428-0200  
Facsimile: 617-428-7045



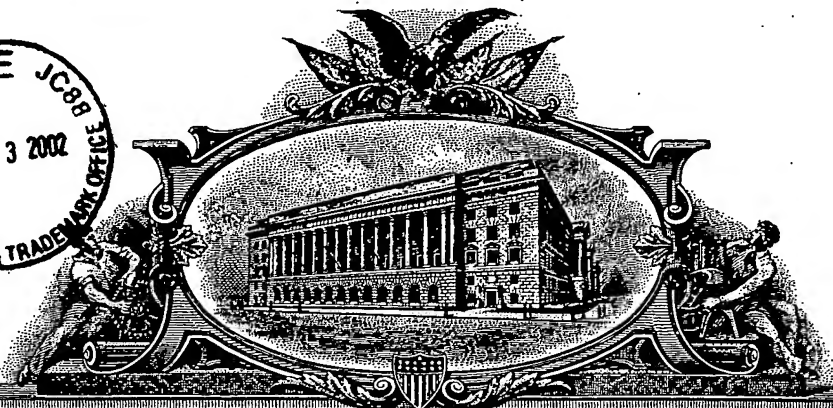
21559

PATENT TRADEMARK OFFICE





PA 533353



# THE UNITED STATES OF AMERICA

**TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:**

**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE**

**United States Patent and Trademark Office**

**March 08, 2002**

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.**

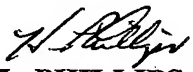
**APPLICATION NUMBER: 60/270,746**

**FILING DATE: February 22, 2001**

BEST AVAILABLE COPY

**By Authority of the  
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**



  
**H. PHILLIPS**  
Certifying Officer



02/22/01  
31026 U.S. PTO

2-23-01

A/PROV

Substitute Form PTO/SB/16 (11-95)  
Approved for use through 01/31/98, OMB 0651-0037  
Patent and Trademark Office; US DEPARTMENT OF COMMERCE

31026 U.S. PTO  
02/22/01  
60/270746

### PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT under 37 CFR 1.53 (c).

Docket Number		50125/020001		Type a plus sign (+) inside this box -->		+	
INVENTOR(S)/APPLICANT(S)							
LAST NAME		FIRST NAME		MIDDLE INITIAL		RESIDENCE (CITY AND EITHER STATE OR FOREIGN COUNTRY)	
Kochanek		Stefan				Köln, Germany	
Schraermeyer		Ulrich				Neuss, Germany	
TITLE OF THE INVENTION (280 characters max)							
PIGMENTEPITHELZELLE DES AUGES, IHRE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG IN DER THERAPIE EINER AUGEN- ODER NERVENERKRANKUNG							
SMALL ENTITY STATUS:							
Applicant claims small entity status under 37 C.F.R. § 1.27.							
CORRESPONDENCE ADDRESS							
Karen L. Elbing, Ph.D. Clark & Elbing LLP 176 Federal Street Boston							
STATE		MA		ZIP CODE		02110-2214	
COUNTRY		USA					
ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)							
<input checked="" type="checkbox"/> Specification		Number of pages: 40		<input checked="" type="checkbox"/> Claim		Number of pages: 04	
<input checked="" type="checkbox"/> Drawings		Number of sheets: 01		<input checked="" type="checkbox"/> Abstract		Number of pages: 01	
METHOD OF PAYMENT OF FILING FEES FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT							
<input checked="" type="checkbox"/> A check or money order is enclosed to cover the filing fees.				FILING FEE AMOUNT		\$75.00	
<input checked="" type="checkbox"/> The Commissioner is hereby authorized to charge filing fees not covered and apply any credits to Deposit Account Number: 03-2095							

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

☒ No.

☐ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are:

Respectfully submitted,

SIGNATURE: Karen L. Elbing  
TYPED OR PRINTED NAME: Karen L. Elbing, Ph.D.

DATE: 22 February 2001  
REGISTRATION NO.: 35238

USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT



21559  
PATENT, TRADEMARK OFFICE







22. Februar 2001

Dr. med. Stefan Kochanek

K35245US BÖ/ATe/plö

Dr. rer. nat. Ulrich Schraermeyer

**Pigmentepithelzelle des Auges, ihre Herstellung und Verwendung in der Therapie einer Augen- oder Nervenerkrankung**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Pigmentepithelzelle des Auges enthaltend Vektor-DNA eines adenoviralen Vektors mit großer DNA-Kapazität, die verbesserte Isolatierung und Kultivierung dieser Zellen und Verfahren zur  
10 Herstellung sowie die Verwendung in der Therapie einer Augen- oder Nervenerkrankung.

Die fünf Primärsinne Tasten, Sehen, Hören, Schmecken und Riechen dienen der Aufnahme von Information aus der Umwelt. Ca. 75 % unserer Wahrnehmungen  
15 laufen über den Gesichtssinn. Dieser hohe Prozentsatz verdeutlicht die herausragende Bedeutung des Sehens in unserem täglichen Leben. Folglich stellt eine Schwächung unserer Sehkraft einen immensen Einschnitt in den Lebensalltag dar.

Das Auge besteht aus einem zusammengesetzten Linsensystem, das auf der  
20 Netzhaut ein umgekehrtes und verkleinertes Bild der Umwelt darstellt. Der dioptrische Apparat besteht aus der durchsichtigen Kornea (Hornhaut), der die Pupille bildenden Iris, der Linse und dem Glaskörper, einer gallertartigen, durchsichtigen Masse im Inneren des Augapfels zwischen Linse und Retina. Fig. 1 zeigt einen schematisierten Horizontalschnitt durch das Auge. Die Hülle des  
25 Augapfels besteht aus 3 Schichten: der Sklera (Lederhaut), der Choroidea (Aderhaut) und der Retina (Netzhaut). Die Retina wiederum besteht aus einer äußeren Schicht, dem retinalen Pigmentepithel (RPE), sowie einer inneren



Die ringförmige Regenbogenhaut (Iris) trennt die vordere von der hinteren Augenkammer und bildet den vorderen Teil der Uvea (Gefäßhaut). Sie besteht von anterior nach posterior aus einer kollagenreichen Extrazellulärmatrrix, dem Irisstroma (es enthält Melanozyten, Fibrozyten, Nerven und Blutgefäße) und dem Irispigmentepithel (IPE).

Das IPE ist zweilagig und besteht aus einer anterioren und einem posterioren Pigmentepithelzellschicht (Freddo TF (1996) Ultrastructure of the iris. Microsc Res Tech 33: 369-389). Die Zellen des posterioren Irispigmentepithels sind durch Tight-Junctions verbunden. Das anteriore Pigmentepithel besitzt zusätzlich glatte Muskelzellen (außer im Bereich des Sphinkters), die zur Dilatation der Iris beitragen (Freddo 1996, supra). Das Irispigmentepithel hat dieselbe embryologische Herkunft wie das retinale Pigmentepithel. Aus einer menschlichen Iris können ca.  $2,3 \times 10^5$  IPE Zellen gewonnen werden, von denen 90 % in Zellkultur überleben (Hu DN, Ritch R, McCormick SA, Pelton-Henrion K (1992) Isolation and cultivation of human iris pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 2443-2453). IPE Zellen sind stark pigmentiert und enthalten viel Eumelanin. Melanin hat folgende schützenden Funktionen. Es kann zweiwertige Eisen Ionen ( $Fe^{2+}$ ) und andere toxische Substanzen (z.B.  $Ca^{2+}$ ) binden und damit dem Zellzytoplasma entziehen (Hill HZ (1992) The function of melanin or six blind people examine an elephant. Bioessays 14: 49-56). Melanin kann außerdem durch Redoxreaktionen  $Fe^{2+}$  in weniger toxisches  $Fe^{3+}$  überführen. Andererseits haben die Vorstufen der Melaninsynthese Dihydroxyindol (DHI) und Dihydroxyindolcarboxylsäure (DHIA) eine sehr starke antioxidative Wirkung, die stärker ist als die von alpha Tocopherol (Memoli S, Napolitano A, d'Ischia M, Misuraca G, Palumbo A, Prota G (1997) Diffusible melanin-related metabolites are potent inhibitors of lipid peroxidation. Biochim Biophys Acta 1346: 61-68). Melanin kann toxische Sauerstoffradikale, die im Auge durch den hohen Sauerstoffpartialdruck in Kombination mit Lichtexposition entstehen, eliminieren.



Auch Elemente, die für die normale Funktion der Retina wichtig sind, wie beispielsweise Zink, werden mit hohem Wirkungsgrad vom Melanin gespeichert. Zink hat als Kofaktor für zum Beispiel antioxidative Enzyme (Superoxid-dismutase) oder bindegewebsabbauende Enzyme (Metalloproteinasen) mehrere  
5 wichtige Bedeutungen im Auge und im zentralen Nervensystem (ZNS).

Das Pigmentepithel spielt eine wichtige Rolle im Stoffwechsel und bei der Lichtabsorption des Auges. Es ist außerdem verantwortlich für die äußere Blut-Retina-Schranke sowie für die Entsorgung abgestoßener Photorezeptorzellen.  
10 Folglich bildet sie ein interessantes Ziel zur gentherapeutischen Behandlung von Augenerkrankungen.

Bisher wurden einige Experimente zur genetischen Modifikation von Pigmentepithelzellen beschrieben, die jedoch im Hinblick auf Dauer und Stabilität der  
15 Expression keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten.

In einer Studie mit Labormäusen wurde ein adenoviraler Vektor der ersten Generation für den Gentransfer in das retinale Pigmentepithel durch subretinale Injektion verwendet, der das E.coli lacZ Gen unter Kontrolle des CMV Promotors  
20 exprimiert. Adenovirale Vektoren der ersten Generation (Gilardi et al., FEBS Letters 267, 60-62, 1990; Stratford-Perricaudet et al., Hum. Gene Ther. 1, 241-256, 1990) sind durch Deletionen der E1A- und E1B-Gene charakterisiert. E1A und E1B haben transformierende und transaktivierende Eigenschaften. In einigen Vektoren ist außerdem E3 deletiert, um die Kapazität für die Aufnahme fremder  
25 DNA zu erhöhen. Obwohl der Gentransfer in das retinale Pigmentepithel effizient war und kurz nach Injektion eine sehr gute Expression im retinalen Pigmentepithel beobachtet wurde, war die Expression transient. 6 Wochen nach Injektion waren nur noch vereinzelt lacZ positive retinale Pigmentepithelzellen zu beobachten (Li T, Adamian M, Roof DJ, Berson EL, Dryia TP, Roessler BJ,  
30 Davidson BL (1994) In vivo transfer of a reporter gene to the retina mediated by an adenoviral vector. Invest Ophthalmol Vis Sci: 35, 2543-2549).



In einer weiteren Untersuchung, die an Laborratten mit einem Beobachtungs-  
zeitraum von 14 Tagen durchgeführt wurde, wurde ein Adenovirus der ersten  
Generation verwendet, der das E.coli lacZ Gen unter Kontrolle des Rous Sarcoma  
5 Virus (RSV) Promotors exprimierte. Obwohl der Gentransfer in das retinale  
Pigmentepithel effizient war und 7 Tage nach Injektion eine sehr gute Expression  
im retinalen Pigmentepithel beobachtet wurde, war die Expression eine Woche  
später reduziert (Rakoczy PE, Lai CM, Shen WY, Daw N, Constable IJ (1998)  
Recombinant adenovirus-mediated gene delivery into the rat retinal pigment  
10 epithelium in vivo. Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology 26  
(Suppl.): S56-S58).

In einer anderen Studie, die an 6 Wochen alten RCS Ratten durchgeführt wurde,  
wurde ein adenoviraler Vektor der ersten Generation verwendet, der das green  
15 fluorescence protein (GFP) Gen unter Kontrolle des CMV Promotors exprimierte  
(Anglade E, Csaky KG (1998) Recombinant adenovirus-mediated gene transfer  
into the adult rat retina. Curr Eye Res 17: 316-321). Obwohl der Gentransfer in  
das retinale Pigmentepithel nach subretinaler Injektion effizient war und 3 Tage  
nach Injektion 30 bis 90 % des retinalen Pigmentepithels im Bereich der  
20 Injektionsstelle GFP positiv waren, war 6 Tage später (also 9 Tage nach Injektion)  
keine GFP Expression mehr nachweisbar.

Während bei den oben genannten Beispielen des Gentransfers im Bereich des  
Auges adenovirale Vektoren der ersten Generation verwendet wurden, wurde in  
25 einer weiteren Publikation für die subretinale Injektion von Mäusen ein  
adenoviraler Vektor verwendet, der als Adenovirus Minichromosom (EAM)  
bezeichnet wird (Kumar-Singh R, Farber DB (1998) Encapsidated adenovirus  
mini-chromosome-mediated delivery of genes to the retina: application to the  
rescue of photoreceptor degeneration. Hum Mol Genet 7: 1893-1900). Hierbei  
30 handelt es sich um einen Vektor, der keine Virusproteine exprimiert. Der Vektor  
exprimierte die beta Einheit der zyklischen GMP Phosphodiesterase (PDE) unter



der Kontrolle des natürlichen PDE Promotors. Ferner exprimierte der Vektor das E.coli lacZ Gen unter Kontrolle des CMV Promotors. Außerdem enthielt der Vektor verschiedene E.coli Plasmidelemente (Plasmid backbone, Ampicillin Resistenzgen, E. coli Ursprung der Replikation). Nach Produktion war der Vektor durch ausgeprägte Variabilität seines Genoms charakterisiert. Monomere und dimere Strukturen wurden beobachtet, letztere in Kopf-Kopf, Kopf-Schwanz und Schwanz-Schwanz Orientierung (head-to-head, head-to-tail und tail-to-tail). Wegen dieser Variabilität und des Vorliegens von Plasmidsequenzen inklusive Antibiotikaresistenz ist dieser Vektor nicht für den therapeutischen Einsatz geeignet. Die Gentransferexperimente wurden an *rd* Mäusen durchgeführt, die ein Tiermodell für retinale Degeneration darstellen und durch eine für die Degeneration ursächliche Mutation in der beta Einheit des PDE Gens charakterisiert sind. In dieser Studie wurde die Expression ausschließlich im neuronalen Anteil der Retina nachgewiesen, nicht jedoch im retinalen Pigmentepithel. Obwohl die neuronalen Zellen post-mitotisch sind und sich also nicht mehr teilen können, war die Expression des PDE Gens nur transient. Durch verschiedene Methoden (RT-PCR, Western Blot Analyse und Bestimmung der PDE Aktivität) wurde nachgewiesen, daß 4 Monate nach Injektion keine Expression mehr nachweisbar war.

Für die Transfektion von IPE Zellen ist bisher lediglich das nicht-virale Transfektionsreagenz Lipofectamine verwendet worden. In dieser Untersuchung wurde das Plasmid pXCN2-bFGF hergestellt, das die bFGF cDNA der Ratte exprimiert. Zusätzlich enthält das Plasmid eine Neomycin Resistenz Gen. Kultivierte IPE Zellen der Ratte wurden mit diesem Plasmid transfiziert. Die Zellen exprimierten die bFGF cDNA in vitro und die Autoren schreiben, daß nach subretinaler Transplantation als Zellsuspension in der RCS Ratte die Degeneration von Photorezeptoren bis zu 4 Wochen verzögert wurde (Tamai M, Yamada K, Takeda N, Tomita H, Abe T, Kojima S, Ishiguro I (1997) bFGF transfected iris pigment epithelial cells rescue photoreceptor cell degeneration in RCS rats. In: La Vail M, eds. Degenerative retinal diseases. 323-328). Da jedoch, wie in der



genannten Arbeit gezeigt, auch in Ratten, die IPE Zellen nach Transfektion mit einem Kontrollplasmid durch subretinale Injektion erhalten hatten, der gleiche Effekt, nämlich Verzögerung der Degeneration von Photorezeptoren beobachtet wurde, der durch die Transfektion nicht verbessert oder verlängert wurde, handelte es sich hier nicht um einen Effekt, der auf einen gezielten Gentransfer zurückgeführt werden konnte, sondern der allein durch die Transplantation der IPE Zellen zu erklären war. Außerdem wurde kein Nachweis einer bFGF Expression nach Transplantation geführt.

Die genannten Publikationen offenbaren daher kein Expressionssystem für Pigmentepithelzellen des Auges, mit dem eine langfristige und stabile Expression eines eingeschleusten Gens beobachtet werden kann. Eine langfristige und stabile Expression eines solchen Gens ist zur Therapie einer Vielzahl von angeborenen und erworbenen Erkrankungen des Auges aber erforderlich. Für viele Anwendungen ist gerade die langfristige Produktion von therapeutischen Proteinen der entscheidende Faktor für das Erzielen eines therapeutischen Effekts.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Pigmentepithelzellen des Auges zur Verfügung zu stellen, die therapeutisch einsetzbar sind.

Die Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung einer Pigmentepithelzelle des Auges.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß eine Pigmentepithelzelle des Auges, die Vektor-DNA eines adenoviralen Vektor mit großer DNA-Kapazität enthält, langfristig stabil mindestens ein eingeführtes Gen exprimiert und somit therapeutisch einsetzbar ist.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Pigmentepithelzelle des Auges, die eine Vektor-DNA eines adenoviralen Vektor mit großer DNA-Kapazität enthält.



Unter einer Pigmentepithelzelle des Auges wird eine Epithelzelle des Auges verstanden, in der Pigment, beispielsweise Melanin, eingelagert ist. Ein Beispiel für eine Pigmentepithelzelle des Auges ist eine retinale Pigmentepithelzelle (RPE) oder eine Irispigmentepithelzelle (IPE).

Unter einem adenoviralen Vektor großer DNA-Kapazität versteht der Fachmann Adenoviren, die keine viralen kodierenden DNA-Sequenzen enthalten (Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, Chen HH, Chan S, Caskey CT (1996) A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 93: 5731-5736; Fisher KJ, Choi H, Burda J, Chen SJ, Wilson JM. (1996); Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. Virology 217: 11-22; Kumar-Singh R, Chamberlain JS (1996) Encapsidated adenovirus minichromosomes allow delivery and expression of a 14 kb dystrophin cDNA to muscle cells. Hum Mol Genet 5: 913-921). Diese Adenoviren enthalten lediglich die viralen Enden unter Einschluß der "inverted terminal repeats" (ITRs) und des Verpackungssignals. Die Kapazität für die Aufnahme fremder DNA beträgt beispielsweise bis zu etwa 37 kb, da der weit überwiegende Teil des adenoviralen Genoms entfernt ist.

Adenoviren sind als Expressionsvektoren, insbesondere im Rahmen der Gentherapie, von besonderer Bedeutung. Ein Vorteil von adenoviralen Vektoren ist die Tatsache, daß diese Vektoren replizierende und nicht-replizierende Zellen *in vitro* und *in vivo* effizient transduzieren können.

Es sind verschiedene Systeme zur Herstellung adenoviraler Vektoren großer DNA-Kapazität beschrieben worden (Kochanek S (1999) High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. Hum Gene Ther 10: 2451-2459). Der Vorteil dieser adenoviralen Vektoren mit großer DNA-Kapazität im Vergleich zu adenoviralen Vektoren der ersten und zweiten



Generation liegt vor allem in der größeren Kapazität. Hierdurch ist es möglich, ein oder mehrere Gene oder Expressionskassetten in die Pigmentepithelzellen einzuführen.

- 5 Nach Aufnahme des adenoviralen Vektors in die Zelle wird die Hülle des Vektor üblicherweise in Endosomen abgebaut. Die verbleibende Vektor-DNA wird dann in den Zellkern transportiert und integriert in der Regel nicht in das zelluläre Genom.
- 10 Ein Beispiel für einen adenoviralen Vektor mit großer DNA-Kapazität ist ein Vektor, der das menschliche alpha1-Antitrypsin Gen exprimiert (Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S (1998) Genomic DNA transfer with a high capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. Nature
- 15 Genetics 18: 180-183). Ein weiteres Beispiel ist eine Vektor, der das Dystrophin Gen und das E.coli lacZ Gene exprimiert (Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, Chen HH, Chan S, Caskey CT (1996) A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 93: 5731-
- 20 5736) In einer bevorzugten Ausführungsform wird HC-AdFK7 oder HC-AdhCMV.PEDF als adenoviralen Vektor mit großer DNA-Kapazität verwendet. HC-AdFK7 ist ein adenoviraler Vektor mit großer DNA-Kapazität, der das "enhanced green fluorecence" Protein (EGFP) unter der Kontrolle des humanen Zytomegalievirus Promotors exprimiert. HC-AdhCMV.PEDF ist ein adenoviraler
- 25 Vektor mit großer DNA-Kapazität, der das humane "pigment epithelial cell derived factor" (PEDF) Gen unter der Kontrolle des Zytomegalievirus Promotors exprimiert. In diesem Vektor ist das PEDF Protein durch das Anheften (Expression als Fusionsprotein) eines Poly-Histidin Epitops markiert, so daß das Protein durch Verwendung eines Anti-Poly-Histidin Antikörpers leicht
- 30 nachgewiesen werden kann.



Wie in den Beispielen gezeigt, sind Pigmentepithelzellen mit einem adenoviralen Vektor großer DNA-Kapazität in vitro sehr effizient transduzierbar. Wie ebenfalls in den Beispielen gezeigt, kommt es nach Transplantation dieser genetisch modifizierten Zellen zu einer sehr langfristigen Genexpression, die konstant über  
5 mindestens 4 Monate nachweisbar ist. Hierbei ist der Ort der Transplantation offenbar nicht kritisch. Nach Transplantation der genetisch modifizierten Pigmentepithelzellen sowohl in das Auge in den subretinalen Raum als auch besonders überraschend in das ZNS in das Corpus striatum führte zu einer langfristigen über mindestens 4 Monate (Auge) bzw. mindestens 2 Monate (ZNS)  
10 nachweisbaren Genexpression.

Die meisten Experimente mit diesen Vektoren wurden bisher in der Leber und in der Skelettmuskulatur durchgeführt. Nach Lebergentransfer mit einem das menschliche alpha1-Antitrypsin exprimierenden Vektor in Pavianen (Morral N,  
15 O'Neal W, Rice K, Leland M, Kaplan J, Piedra PA, Zhou H, Parks RJ, Velji R, Aguilar-Cordova E, Wadsworth S, Graham FL, Kochanek S, Carey KD, Beaudet AL (1999) Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. Proc Natl Acad Sci USA 96: 12816-12821) kam es in zwei von drei  
20 Tieren zwar zu einer längerfristigen Expression (länger als ein Jahr), dennoch wurde im Gegensatz zu der vorliegenden Erfindung eine kontinuierliche Abnahme der Expression beobachtet, die in einem der Tiere nach 16 Monaten noch 19 % und in dem zweiten Tier nach 24 Monaten noch 8 % der Ausgangswerte betrug. In einem dritten Tier kam es zu einem vollständigen  
25 Verlust der Expression innerhalb von 10 Wochen. Über den Grund für die langsame Abnahme der Expression in den zwei Tieren mit der verlängerten Expression wurde spekuliert. Sowohl Wachstum der Tiere als auch langsame Zellteilung der Hepatozyten wurden diskutiert. Letztlich ist die Ursache für den langsamen Verlust der Expression nicht geklärt. In dem Tier, in dem ein rascher  
30 Verlust der Expression beobachtet wurde, wurde die Entstehung von Antikörpern beobachtet, die gegen das menschliche alpha1-Antitrypsin gerichtet waren.



Eine deutlichen Abnahme der Expression eines LacZ Reportergens nach Gentransfer in die Leber mit einem adenoviralen Vektor großer DNA-Kapazität innerhalb von 30 Tagen nach Injektion wurde in einer weiteren Studie beobachtet

- 5 (Parks RJ, Bramson JL, Wan Y, Addison CL, Graham FL (1999) Effects of stuffer DNA on transgene expression from helper-dependent adenovirus vectors. J Virol 73: 8027-8034).

- Die Skelettmuskulatur ist ein Gewebe, das in bezug auf den natürlichen Umsatz  
10 [Turnover] der Zellen den Pigmentepithelzellen des Auges ähnelt. Die Skelettmuskelzellen sind postmitotische Zellen. Dies bedeutet, daß sie sich, ähnlich wie Pigmentepithelzellen, nicht mehr teilen. Besondere Erfahrung besteht im Gentransfer in die Skelettmuskulatur von Labortieren unter Verwendung von  
15 adenoviralen Vektoren großer DNA-Kapazität. In diesen Experimenten erfolgte der Gentransfer ähnlich wie bei der vorliegenden Erfindung durch direkte Injektion in das Gewebe. Obwohl nach Gentransfer unter Verwendung eines adenoviralen Vektoren großer DNA-Kapazität, der sowohl die Dystrophin cDNA als auch das E.coli LacZ Gen exprimierte, eine Expression über einen längeren Zeitraum zu verzeichnen war, wurde dennoch beobachtet, daß die Expression  
20 innerhalb von 84 Tagen wiederum abnahm (Chen HH, Mack LM, Kelly R, Ontell M, Kochanek S, Clemens PR (1997) Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes. Proc Natl Acad Sci USA 94: 1645-1650). In immunokompetenten Tieren, die keine Toleranz gegenüber der E.coli beta-Galaktosidase aufwiesen, kam es zu einem vollständigen Verlust der Expression  
25 nach 84 Tagen.

- Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Experimenten war die Stabilität der Expression der Gene, die mittels Gentransfer mit einem adenoviralen Vektor großer DNA-Kapazität in die Pigmentepithelzelle eingeschleust  
30 worden waren, überraschenderweise groß. Die Vorteile der adenoviralen Vektoren großer DNA-Kapazität bei der erfindungsgemäßen Transfektion von



Pigmentepithelzellen des Auges gegenüber den bekannten Transfektionssystemen sind folglich

- die Gewährleistung einer stabilen Genexpression;
- 5 • die Möglichkeit, regulierte Genexpression durch Verwendung konstitutiver, gewebespezifischer, regulierbarer Promotoren und regulierbarer Expressionssysteme zu erzielen;
- fehlende Immunogenität und Toxizität des Vektors;
- hohe Transduktionseffizienz bei Verwendung von Pigmentepithelzellen.

10

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält daher der adenovirale Vektor eine therapeutische Nukleinsäure, insbesondere eine therapeutische DNA, die nicht von dem adenoviralen Vektor abstammt. Hierbei könnte es sich beispielsweise um ein therapeutisches Gen handeln. Unter einem therapeutischen Gen versteht der  
15 Fachmann ein Gen, dessen Expressionsprodukt zur Therapie oder Diagnose einer Krankheit dienen kann.

Unter einer Nukleinsäure versteht man ein Polymer, das bei Hydrolyse in Zucker, insbesondere Pentosen, vor allem Ribose und Desoxyribose, heterozyklische  
20 organische Basen, insbesondere Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin und Uracil, und Phosphorsäure gespalten wird. Die Nukleinsäure kann beispielsweise eine DNA oder RNA sein. Eine therapeutische Nukleinsäure ist eine Nukleinsäure, die selbst oder deren Produkt eine therapeutische Wirkung hervorruft.

25 Unter einem Gen versteht man einen linearen DNA-Abschnitt, der für ein Protein oder eine RNA codiert. Das therapeutische Gen, das durch Gentransfer in die Pigmentepithelzelle eingebracht wird, kann unterschiedlicher Natur sein. Die Wahl wird vom therapeutischen Ziel bestimmt. Zum Beispiel kann ein Gen verwendet werden, das für einen neurotrophen Faktoren kodiert. Beispiele für  
30 neurotrophe Faktoren sind der "glial cell derived neurotrophic factor" (GDNF) und der "pigment epithelial cell derived factor" (PEDF). Zum Beispiel können



auch Gene verwendet werden, die Neoangiogenese verhindern. Ein Beispiel ist der lösliche Rezeptor für den "vascular endothelial cell growth factor" (VEGF) mit der Bezeichnung löslicher "vascular endothelial cell growth factor receptor-1 (sflt1) (Roeckl W, Hecht D, Sztajer H, Waltenberger J, Yayon A, Weich HA  
5 (1998) Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptors 1 and 2. Experimental cell research 241: 161-1709. Ein weiteres Beispiel ist ein dominant-negativer VEGF Rezeptor 2 (KDR) (Machein MR, Risau W, Plate KH (1999) Antiangiogenic gene therapy in a rat glioma model using a dominant-negative vascular endothelial growth factor receptor 2. Hum  
10 Gene Ther 10: 1117-1128). Weitere therapeutische Gene könnten beispielsweise NGF, BDNF, CNTF, bFGF oder Neurotrophin 3,4-5 sein.

PEDF hat sehr starke neurotrophe und neuroprotektive Wirkung (King GL, Suzuma K (2000) Pigment-epithelium-derived factor--a key coordinator of retinal  
15 neuronal and vascular functions. N Engl J Med 342: 349-351). Dieser Faktor wird unter normoxischen Bedingungen vom RPE gebildet. Bei Hypoxie wird die Produktion eingestellt. Hierdurch wird die Neovaskularisation stark gefördert. Bei der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) bilden die geschädigten RPE Zellen zu wenig PEDF. Hierdurch wird eine unkontrollierte Gefäßneubildung  
20 induziert. Im Auge besteht die zentrale Wirkung von PEDF darin, die Neubildung von Gefäßen zu verhindern.

Gemäß der vorliegenden Erfindung kann daher eine genetisch modifizierte Pigmentepithelzelle eine Pigmentepithelzelle sein, die nach genetischer  
25 Modifikation mit einem PEDF exprimierenden adenoviralen Vektor großer DNA-Kapazität PEDF sezerniert. Diese Zelle kann dann beispielsweise in den subretinalen Raum nahe der Makula bei Patienten im Anschluß an die chirurgische Entfernung von Neovaskularisationsmembranen transplantiert werden. Die Pigmentepithelzelle kann so einerseits das entfernte retinale  
30 Pigmentepithel ersetzen und andererseits den für die Verhinderung der Neovaskularisation wesentlichen PEDF Faktor produzieren. Hierdurch wird das



Visus stabilisiert. PEDF kann außerdem vor Glutamat vermittelter Neurotoxizität schützen.

Desweiteren können je nach Krankheitsursache verschiedene therapeutische Gene  
5 von dem adenoviralen Vektoren großer DNA-Kapazität einzeln oder in Kombination exprimiert werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform steht das Gen unter der Kontrolle  
eines viralen oder nicht-viralen Promotors, der konstitutiv, gewebespezifisch  
10 und/oder regulierbar aktiv ist.

Unter einem konstitutiv aktiven Promotor versteht man einen Promotor, der in  
nahezu allen Geweben und nahezu unabhängig vom physiologischen Zustand der  
Zelle die Transkription des nachgeschalteten Gens vermittelt. Ein Beispiel für  
15 einen konstitutiv aktiven Promotor ist der SV40- oder der Zytomegalie-Virus-  
Promotor.

Unter einem gewebespezifischen Promotor versteht man einen Promotor, der die  
Transkription des nachgeschalteten Gens nur in einem bestimmten Gewebe  
20 vermittelt. Die Verwendung des gewebespezifischen Promotors erlaubt die  
gewebespezifische Expression eines Proteins oder einer funktionellen RNA in IPE  
oder in RPE Zellen. Ein Beispiel für einen solchen gewebespezifischen Promotor  
ist der Transthyretin Promotor, der eine gute Aktivität in RPE und in IPE Zellen  
hat.

25 Unter einem regulierbaren Promotor versteht man einen Promotor, der  
beispielsweise in Abhängigkeit von der Stoffwechselsituation der Zelle, der  
Konzentration eines Moleküls oder der Temperatur die Transkription eines Gens  
vermittelt. Die Genexpression kann quantitativ und qualitativ durch die  
30 Verwendung eines regulierbaren Promotors kontrolliert werden. Ein Beispiel für  
einen regulierbaren Promotors ist ein Promotor, der durch Einschluss eines



Hypoxie-sensitiven Elements im Falle einer Hypoxie aktiviert wird (Boast K, Binley K, Iqball S, Price T, Spearman H, Kingsman S, Kingsman A, Naylor S (1999) Characterization of physiologically regulated vectors for the treatment of ischemic disease. *Hum Gene Ther* 10: 2197-2208).

5

Es kann aber auch ein regulierbares Expressionssystem verwendet, das beispielsweise bei Gabe eines Medikamentes induziert oder inaktiviert wird. Ein Beispiel für ein solches System ist ein Tetrazyklin-abhängiges Genexpressions-system (Freundlieb S, Schirra-Muller C, Bujard H (1999) A tetracycline  
10 controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J Gene Med* 1:4-12).

Nach der Transduktion der Pigmentepithelzelle mit einem adenoviralen Vektor mit großer DNA Kapazität kann die Zelle therapeutische Proteine oder RNAs  
15 produzieren. Ein therapeutisches Protein ist ein Protein, das eine therapeutische Wirkung hervorruft. Analoges gilt für eine therapeutische RNA, beispielsweise eine anti-sense RNA oder ein Ribozym. Beispiele für therapeutische Proteine sind die neurotrophen Faktoren PEDF, GDNF, NGF, BDNF, CNTF, bFGF oder Neurotrophin 3,4-5 (Friedman WJ, Black IB, Kaplan DR (1998) Distribution of  
20 the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 in the postnatal rat brain: an immunocytochemical study. *Neuroscience* 84:101-114) sowie anti-angiogenetisch wirksamen Faktoren, wie zum Beispiel der lösliche VEGF Rezeptor-1 (sflt-1), der dominant-negativen VEGFR-2 (KDR), sowie wiederum PEDF, das neben seiner neurotrophen  
25 Funktion auch anti-angiogenetische Wirkung hat (Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP (1999) Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285: 245-248).

Weitere Beispiele für therapeutische Gene sind lysosomale Enzyme (Cingle KA,  
30 Kalski RS, Bruner WE, O'Brien CM, Erhard P, Wyszynski RE (1996) Age-related changes of glycosidases in human retinal pigment epithelium. *Curr Eye Res* 115:



433-438) alpha-Mannosidase, beta-galactosidase, N-acetyl-beta-glucosaminidase und N-acetyl-beta-galactosaminidase sowie Lipase. Diese Enzyme spielen beim Abbau von Schzellmembranen eine wichtige Rolle und können bei der AMD vermindert sein.

5

Noch weitere Beispiele sind Gene, die für antioxidative Enzyme (Superoxiddismutase, Katalase, Peroxydase) kodieren, da diese ebenfalls in der Pathogenese von AMD eine Rolle spielen können. (Frank RN, Amin RH, Puklin JE (1999) Antioxidant enzymes in the macular retinal pigment epithelium of eyes with neovascular age-related macular degeneration, J Ophthalmol 127:694-709).

10

Weitere Beispiele sind Gene für Genprodukte, die die Aderhautdurchblutung steigern können, beispielsweise NO-Synthasen, da verminderte Aderhautdurchblutung bei der Pathogenese von AMD eine Rolle spielen können. (Luksch A, Polak K, Beier C, Polska E, Wolzt M, Dörner GT, Eichler HG, Schmetterer L (2000) Effects of systemic NO synthase inhibition on choroidal and optic nerve head blood flow in healthy subjects. Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 3080-3084).

15

Ein weiterer Gegenstand vorliegenden Erfindung ist eine Pigmentepithelzelle in einem festen Zellverband, einem sog. Zellsheet. Im Rahmen der experimentellen Therapie der AMD wurden bisher immer nur Einzelzellsuspensionen von autologen IPE Zellen transplantiert. Der Vorteil solcher Zellsheets besteht darin, daß man die Zellen transplantationstechnisch deutlich besser plazieren kann und daß das Wegwandern der Zellen vom Transplantationsort verhindert wird.

20

25

Pigmentepithelzellen in einem festen Zellverband sind dadurch gekennzeichnet, daß der Zellverband aus mindestens ca. 100, bevorzugt ca. 1000, besonders bevorzugt ca. 10000 Pigmentepithelzellen besteht und diese nicht durch moderate Scherkräfte, insbesondere durch wiederholtes, beispielsweise zehnmaliges, Auf- und Abbewegen in einer Lösung mittels Pipette, nicht voneinander getrennt werden können.

30



Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Kultivierungssystem  
enthaltend mindestens eine Pigmentepithelzelle des Auges und einen „feeder  
layer“. Üblicherweise ist die Vermehrung von IPE- und RPE Zellen nach ihrer  
Isolierung sehr langwierig. Durch das erfindungsgemäße Kultivierungssystem  
5 lassen sich große Zahlen von IPE- und RPE Zellen in sehr kurzer Zeit  
produzieren.

Unter einem „feeder layer“ versteht der Fachmann Zellen, die mit anderen Zellen  
(Zielzellen) kokultiviert werden und das Wachstum der Zielzellen positiv  
10 beeinflussen. Unter einer positiven Beeinflussung kann beispielsweise ein  
schnelleres Wachstum der Zellen oder die Verhinderung von Differenzierung oder  
Dedifferenzierung verstanden werden. Dies geschieht beispielsweise dadurch, daß  
von den Zellen des „feeder layer“ Moleküle in das Medium abgesondert werden,  
die dann das Wachstum der Zielzelle positiv beeinflussen.

15 In der Regel werden inaktivierte Fibroblasten als „feeder layer“ zur Kultivierung  
von embryonalen Stammzellen verwendet werden. Die Inaktivierung der  
Fibroblasten kann beispielsweise durch Behandlung mit Mitomycin C oder durch  
 $\gamma$ -Strahlenexposition erreicht werden. Es können beispielsweise Fibroblasten eines  
20 Säugetiers, insbesondere der Maus oder des Menschen, verwendet werden. In  
einer Ausführungsform werden die Fibroblasten und Pigmentepithelzellen der  
gleichen Spezies, insbesondere des selben Individuums, verwendet. Bei den  
Fibroblasten kann es sich aber auch um eine permanente Zelllinie, beispielsweise  
STO-Fibroblasten oder 3T3 Fibroblasten, oder um primäre embryonale  
25 Fibroblasten handeln. Die Herstellung der Fibroblasten ist dem Fachmann bekannt  
(z. B. Abbondanzo S, Gadi I, Stewart C (1993) Derivation of embryonic stem cell  
lines. Methods in Enzymology 225: 803-823).

Das Kultivierungssystem könnte beispielsweise ein Kulturgefäß beinhalten, in  
30 dem die Pigmentepithelzellen des Auges und der „feeder layer“ in einem  
geeigneten Medium unmittelbar aneinander angrenzend, insbesondere



übereinander kultiviert werden. Die unterschiedlichen Zellen aber auch in einem Kulturgefäß räumlich voneinander getrennt kultiviert werden, so daß der Austausch von beispielsweise Faktoren zur Wachstumsstimulation lediglich über das Medium erfolgt.

5

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer Pigmentepithelzelle des Auges, wobei die Zelle mit Hilfe eines adenoviralen Vektors großer DNA-Kapazität genetisch modifiziert wird.

10

Unter einer genetischen Modifikation versteht der Fachmann jegliche Veränderung der Erbinformation der Zellen. Dies kann beispielsweise durch ein- oder mehrfache Nukleotidaddition, -insertion, -substitution und/oder -deletion erreicht werden. In einer besonderen Ausführungsform wird die genetische Modifikation durch Gentransfer herbeigeführt, wobei das Gen beispielsweise extrachromosomal in der Zelle vorliegen kann.

15

Unter Gentransfer versteht man das Einbringen eines oder mehrerer Gene in beispielsweise eine Zelle. In der vorliegenden Erfindung kann beispielsweise mindestens ein Gen mit Hilfe eines adenoviralen Vektors mit großer DNA-Kapazität in eine Pigmentepithelzelle eingebracht werden. Üblicherweise werden cDNAs verwendet. Es können jedoch auch die Gene selbst (einschließlich ihrer Introns und Exons) verwendet werden. In einer anderen Ausführungsform kann aber auch ein genetisch modifiziertes, natürlich vorkommendes Gen oder künstliche Nukleinsäuren in die Pigmentepithelzelle eingeführt werden.

20

25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer Pigmentepithelzelle des Auges enthaltend einen adenoviralen Vektors großer DNA-Kapazität, wobei die Zelle in Serum-freiem Medium, in Gegenwart eines „feeder layer“ und/oder in einem festen Zellverband kultiviert wird.

30

1000-514200



Zur Isolierung von Pigmentepithelzelle in einem festen Zellverband wird die Iris oder ein Teil der Iris oder die Retina, insbesondere im peripheren retinalen Bereich, beispielsweise mechanisch oder enzymatisch, insbesondere mit  
5 Accutase, Chondroitinase und/oder Heparinase, insbesondere vom Stroma und der Basalmembran, getrennt. Das Zellsheet kann dann in Zellkultur weiter kultiviert werden. Bei Bedarf können die Zellsheets durch erneute Accutaseinkubation in Einzellzellen zerlegt werden.

10 In Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, daß ein Zellkulturmedium, das kein Serum beispielsweise foetales Kälberserum enthält, das Wachstum der Pigmentepithelzellen des Auges positiv beeinflußt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von  
15 genetisch modifizierten Pigmentepithelzellen zur Therapie Augenerkrankungen, wobei es sich sowohl um eine angeborene als auch um eine erworbene Augenerkrankung handeln kann. Beispiele für erworbene oder angeborene Augenerkrankungen sind die altersabhängige Makuladegeneration, das Glaukom, und die diabetische Retinopathie.

20

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist der häufigste Grund für die gesetzliche Erblindung in westlichen Ländern. Durch Atrophie des submakulären retinalen Pigmentepithels und durch die Entwicklung choroidaler Neovaskularisationen (CNV) kommt es sekundär zum Verlust der zentralen  
25 Sehschärfe. Für die Mehrzahl der Patienten mit subfovealer CNV und geographischer Atrophie ist derzeit keine Behandlung zur Vermeidung des Verlustes der zentralen Sehschärfe verfügbar. Frühe Zeichen von AMD sind Ablagerungen (Drusen) zwischen retinalem Pigmentepithel und Bruch's Membran. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Einsprossung von  
30 Aderhautgefäßen in den subretinalen Raum der Makula. Dies führt zum Verlust des zentralen Sehens und der Lesefähigkeit. Ein Beispiel für ein therapeutisches



Gen, das für die Therapie des AMD eingesetzt werden kann, ist das PEDF Gen.

Glaukom bezeichnet eine Gruppe von Krankheiten, bei denen der Druck im Auge anomal ansteigt. Dies führt zu Einschränkungen des Gesichtsfeldes und zu einem  
5 allgemeinen Nachlassen der Sehfähigkeit. Die häufigste Form ist das primäre Glaukom; hier werden zwei Formen unterschieden: das chronische Weitwinkel-Glaukom und die akute Winkelblockung. Das sekundäre Glaukom kann durch Infektionen, Tumoren oder Verletzungen verursacht werden. Ein dritter Typ, das angeborene Glaukom, geht in der Regel auf Entwicklungsstörungen während der  
10 Schwangerschaft zurück. Die Kammerflüssigkeit im Augapfel steht unter einem bestimmten Druck, der für die optischen Eigenschaften des Auges notwendig ist. Dieser Augeninnendruck beträgt normalerweise 15 bis 20 Millimeter Quecksilbersäule und wird durch das Gleichgewicht zwischen Flüssigkeitsproduktion und Flüssigkeitsabfluss gesteuert. Beim Glaukom ist der Abfluss der Kammerflüssigkeit  
15 im Winkel der vorderen Augenkammer blockiert, so dass der Druck im Augeninneren ansteigt. Meist entwickelt sich das Glaukom im mittleren oder fortgeschrittenen Alter, aber auch angeborene Formen sowie Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen sind nicht selten. Obwohl der Augeninnendruck nur mäßig erhöht ist und ansonsten keine Symptome zu erkennen sind, treten  
20 schleichende Schäden auf, insbesondere eine Einschränkung des Gesichtsfeldes. Die akute Winkelblockung dagegen verursacht Schmerzen, Rötungen, eine Erweiterung der Pupillen und schwere Sehstörungen. Die Hornhaut trübt sich, und der Augeninnendruck ist stark erhöht. Im weiteren Verlauf der Krankheit wird das Gesichtsfeld immer enger, was sich mit dem Perimeter, einem augenärztlichen  
25 Instrument, leicht nachweisen lässt. Das chronische Glaukom spricht im Allgemeinen gut auf lokal verabreichte Medikamente an, die den Flüssigkeitsabfluss verstärken. Zur Verminderung der Flüssigkeitsproduktion werden manchmal systemische Wirkstoffe gegeben. Nicht immer jedoch ist die medikamentöse Behandlung erfolgreich. Bei Versagen der medikamentösen  
30 Therapie kommen Lasertherapie oder herkömmliche Operationen zum Einsatz, um einen neuen Abfluss für die Kammerflüssigkeit zu schaffen. Das akute



Glaukom ist ein medizinischer Notfall. Wird der Augennendruck nicht innerhalb von 24 Stunden gesenkt, treten dauerhafte Schäden ein.

5 Eine Reihe von Wachstums- oder neurotrophen Faktoren kann das Überleben glaukomatöser Neurone verlängern. Dazu gehören NGF, BDNF, CNTF, bFGF und Neurotrophin 3,4-5. In einer bevorzugten Ausführungsform könnten genetisch modifizierte Pigmentepithelzellen zur Therapie eines Glaukoms verwendet werden, die als therapeutisches Gen das Gen für NGF, BDNF, CNTF, bFGF und/oder Neurotrophin 3,4-5 enthalten. Diese Faktoren könnten dann das Überleben durch Aktivierung spezieller Stoffwechselwege regulieren. Viele dieser Faktoren haben eine kurze Halbwertszeit. Die stabile Expression dieser Faktoren ist folglich von erheblicher therapeutischer Bedeutung.

15 Die Diabetische Retinopathie entsteht bei Diabetes mellitus infolge einer Glykosylierung von Proteinen eine Verdickung der Basalmembran der Gefäßendothelien. Sie ist die Ursache für eine frühzeitige Gefäßsklerose und die Bildung von Kapillaraneurysmen. Diese Gefäßveränderungen führen im Verlauf von Jahren zur Diabetischen Retinopathie. Die Gefäßveränderungen rufen eine Minderperfusion von Kapillargebieten hervor. Dies führt zu Lipoidablagerungen (harte Exsudate) und zu einer Vasoproliferation. Der klinische Verlauf kann bei Patienten mit Diabetes mellitus verschieden sein. Beim Altersdiabetes (Typ II Diabetes) treten zunächst Kapillaraneurysmen auf. Danach erscheinen aufgrund der verschlechterten Kapillarperfusion harte und weiche Exsudate und fleckförmige Blutungen im Netzhautparenchym. In späteren Stadien der Retinopathia diabetica sind die Verfettungen kranzförmig um die Makula angeordnet (Retinitis circinata). In Verbindung mit diesen Veränderungen kommt es häufig zu einem Ödem am hinteren Augenpol. Wenn das Ödem die Makula einbezieht, ist das Sehvermögen akut hochgradig vermindert. Das Hauptproblem beim Typ-1-Diabetes ist die Gefäßproliferation im Bereich des Augenhintergrunds. Standardtherapie ist die Laserkoagulation der betroffenen Bereiche des Augenhintergrundes. Zunächst wird die Laserkoagulation fokal in den betroffenen



Netzhautarealen durchgeführt. Bei Fortbestehen der Exsudate wird die Laserkoagulation flächenhaft ausgedehnt. Die Netzhautmitte mit der Stelle des schärfsten Sehens, also die Makula und das papillomakuläre Bündel, kann nicht koaguliert werden, da es durch den Eingriff zur Zerstörung der für das Sehen wichtigsten Netzhautteile käme. Sind bereits Proliferationen entstanden, müssen oft die Herde an der Basis der Proliferationen sehr dicht gesetzt werden. Dabei wird die Netzhaut flächenhaft zerstört. Es entsteht ein entsprechender Gesichtsfeldausfall. Beim Typ-1-Diabetes ist die rechtzeitige Laserkoagulation häufig die einzige Chance, die Patienten vor der Erblindung zu bewahren.

10

Ein Beispiel für eine genetisch bedingte Erkrankung des Pigmentepithels die autosomal-rezessive schwere retinale Dystrophie mit Beginn in der Kindheit, die durch Mutation in dem RPE65 Gen verursacht wird (Gu SM, Thompson DA, Srikumari CR, Lorenz B, Finckh U, Nicoletti A, Murthy KR, Rathmann M, Kumaramanickavel G, Denton MJ, Gal A (1997) Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. Nat Genet 17: 194-197. Von dem Einbringen des RPE65 Gens mit Hilfe eines adenoviralen Vektors mit großer DNA Kapazität ist eine Korrektur des pathologischen Phänotyps zu erwarten.

20

Weiterhin war völlig überraschend, daß Pigmentepithelzellen des Auges auch in das ZNS transplantiert werden können. Es konnte in Rahmen der vorliegenden Erfindung gezeigt werden, daß Pigmentepithelzellen den Beobachtungszeitraum von 5 Wochen überlebten. Die histologische Untersuchung ergab keinen Anhaltspunkt für die Induktion einer Schädigung neuraler Zellen. Stattdessen konnte beobachtet werden, daß die Pigmentepithelzellen intensive Kontakte mit Neuronen bildeten.

30 Bisher wurden eine Reihe von verschiedene Zelltypen im Tierexperiment oder bei Patienten mit Morbus Parkinson im Rahmen von klinischen Studien eingesetzt:



- Beispiele sind fetale Zellen, gewonnen aus Gehirnen von menschlichen Feten. Fetale Zellen aus dem ventralen Mittelhirn oder dopaminerge Neurone wurden bereits in klinischen Studien bei über 300 Patienten mit Morbus Parkinson transplantiert (zur Übersicht siehe Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD, Hughes PE (2000) Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol* 60: 409-470). Eine Reihe von verschiedenen Zelltypen, darunter auch nicht neuronale Zellen z.B. Zellen aus der Niebennierenrinde, Sertolizellen aus den Keimdrüsen oder Glomuszellen aus den Carotiden, Fibroblasten oder Astrozyten wurden bei Patienten mit Morbus Parkinson oder Tiermodellen verwendet, mit dem Ziel Dopamin spontan oder nach Gentransfer (Alexi et al. 2000, supra) zu substituieren. Die Überlebensrate transplantiert fetaler dopaminerg Neurone liegt bei 5-8 %, was bereits geringe Verbesserung der klinischen Symptome verursachte (Alexi et al. 2000, supra).
- 15 In den letzten Jahren wurden neuronale Stammzellen aus Gehirnen von adulten Vertebraten isoliert, in-vitro expandiert und ins ZNS reimplantiert, worauf sie sich in reife Neurone differenzierten. Ihre Funktion im ZNS bleibt aber ungewiß. Neuronale Vorläuferzellen wurden auch für Gentransfer benutzt (Raymon HK, Thode S, Zhou J, Friedman GC, Pardinas JR, Barrere C, Johnson RM, Sah DW (1999) Immortalized human dorsal root ganglion cells differentiate into neurons with nociceptive properties. *J Neurosci* 19: 5420-5428). Schwannsche Zellen, die NGF und GDNF überexprimierten hatten Neuroprotektion in Parkinsonmodellen (Wilby MJ, Sinclair SR, Muir EM, Zietlow R, Adcock KH, Horellou P, Rogers JH, Dunnett SB, Fawcett JW (1999) A glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting clone of the Schwann cell line SCTM41 enhances survival and fiber outgrowth from embryonic nigral neurons grafted to the striatum and to the lesioned substantia nigra. *J Neurosci* 19: 2301-2312).
- 20 25 30 Der Vorteil der Pigmentepithelzellen gegenüber den bisher verwendeten Zellen besteht darin, daß sie insbesondere bei Verwendung körpereigener (autologe)



Zellen nicht vom Immunsystem abgestoßen werden und damit erwartungsgemäß eine sehr hohe Überlebensrate haben. Außerdem ersetzen sie natürliches Melaninpigment, welches in der Substantia nigra von Parkinson Patienten verloren geht. Dieses Melanin kann freies  $Fe^{++}$  detoxifizieren und damit den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung von Pigmentepithelzellen zur Therapie von Nervenerkrankungen, insbesondere einer Erkrankung des Nervensystems, bevorzugt des ZNS, vor allem von Morbus Parkinson.

Ein Beispiel für eine häufige Erkrankung des ZNS ist der Morbus Parkinson, bei der es sich um eine chronisch-degenerative Erkrankung des Gehirns handelt. Ursache der Erkrankung ist die Degeneration von spezialisierten neuronalen Zellen im Bereich der Basalganglien. Wegen des Untergangs dopaminerger Neurone kommt es beim Patienten mit Morbus Parkinson zur verminderten Synthese von Dopamin, einem wichtigen Neurotransmitter. Standardtherapie ist die medikamentöse Therapie mit L-Dopa. L-Dopa wird in den Basalganglien zu Dopamin metabolisiert und übernimmt dort die Funktion des fehlenden endogenen Neurotransmitters. Nach einigen Jahren verliert die L-Dopa Therapie jedoch ihre Wirksamkeit.

Pigmentepithelzellen produzieren bereits spontanerweise einige Faktoren, die eine neuroprotektive Wirkung haben. Beispiele für solche Faktoren sind, die beispielsweise von IPE Zellen produziert werden sind "nerve growth factor" (NGF), "ciliary neurotrophic factor" (CNTF), "basic fibroblast growth factor" (bFGF) oder Faktoren mit angiogener Wirkung wie zum Beispiel "vascular endothelial growth factor" (VEGF) oder "platelet derived growth factors A und B" (PDGF A+B). Ein Beispiel für einen neurotrophen Faktor, der in den genetisch modifizierten IPE Zellen nach Gentransfer produziert werden kann, ist der "glial cell derived neurotrophic factor" (GDNF).



Außerdem kann die natürliche Schutzfunktion der Pigmentepithelzellen ausgenutzt werden. Bei Morbus Parkinson könnten transplantierte IPE Zellen durch die antioxidative Wirkung ihrer Melaningranula neuroprotektive Wirkung entfalten. Dieses könnte durch die Fähigkeit des Melanins und seiner Vorstufen verursacht werden,  $\text{Fe}^{2+}$  und andere toxische Substanzen (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ) zu binden und damit dem Zellzytoplasma zu entziehen (Hill HZ (1992) The function of melanin or six blind people examine an elephant. Bioessays 14: 49-56) bzw. sehr stark antioxidativ zu wirken. IPE Zellen haben einen hohen Melaningehalt und fahren auch dann fort, Melanin zu bilden, wenn sie in der Netzhaut, dem subretinalen Raum oder dem ZNS lokalisiert sind. Ein eindeutiger Hinweis hierfür ist das Vorliegen von zahlreichen frühen Melanogenesestadien (Prämelanosomen), die durch elektronenmikroskopische Untersuchungen nachgewiesen werden konnte. Melanin hat antioxidative Eigenschaften, schützt vor Lipidperoxidation, kann direkt Sauerstoffradikale binden (Hill HZ (1992) The function of melanin or six blind people examine an elephant. Bioessays 14: 49-56) und kann die Bildung neuer Sauerstoffradikale durch Bindung von Metallkationen verhindern (Memoli S, Napolitano A, d'Ischia M, Misuraca G, Palumbo A, Prota G (1997) Diffusible melanin-related metabolites are potent inhibitors of lipid peroxidation. Biochim Biophys Acta 1346: 61-68). Bringt man stark pigmentierte Irispigmentepithelzellen in Gewebe mit hohem oxidativen Stress, zum Beispiel in die Substantia nigra von Patienten mit Morbus Parkinson, oder in die Papille von Glaukompatienten, oder in die Nähe der Makula von AMD Patienten, dann tritt bereits durch die Anwesenheit des Melanins in den IPE Zellen neuroprotektive Wirkung ein.

Ein Beispiel für ein Protein mit gutem therapeutischen Potential für die Therapie von Patienten mit Morbus Parkinson ist glial cell derived neurotrophic factor (GDNF) ein Überlebensfaktor für dopaminerge Neurone. GDNF wirkt bereits in picomolarer Konzentration auf Überlebensrate und Wachstum dopaminerger Neurone aus embryonalem Hirn. Tierexperimentelle Untersuchungen haben



- gezeigt, daß direkter Gentransfer in die Substantia nigra einer GDNF Expressionskassette unter Verwendungen verschiedener Vektoren (adenovirale Vektoren der ersten Generation, AAV Vektoren oder lentivirale Vektoren) dopaminerge Neurone im 6-OHDA Rattenmodel schützen konnte (Mandel RJ, Spratt SK, Snyder RO, Leff SE (1997) Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 94: 14083-14088). In einer bevorzugten Ausführungsform wird GDNF in autologen IPE Zellen nach
- 5 Transduktion mit einem adenoviralen Vektors großer DNA-Kapazität exprimiert. Die derart genetisch modifizierten Zellen werden dann stereotaktisch an den Wirkort, zum Beispiel in das Striatum, implantiert. In einer weiteren Ausführungsform wird das für das therapeutische Protein kodierende Gen reguliert exprimiert, zum Beispiel durch Verwendung eines zellspezifischen
- 10 Promotors. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das therapeutische Gen regulierbar, zum Beispiel durch Verwendung eines Tetrazyklin regulierbaren Systems exprimiert.
- In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung werden Pigmentepithel-
- 20 zellen an den gewünschten Ort im ZNS implantiert. Die Zellen können beispielsweise durch Injektion, zum Beispiel im Rahmen einer stereotaktischen Operation, an den gewünschten Wirkort gebracht. Hierdurch ist es möglich spezifische therapeutische Moleküle vor Ort zu produzieren.
- 25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden autologe Pigmentepithelzellen verwendet. Die Verwendung von autologen Pigmentepithelzellen hat folgende Vorteile gegenüber anderen Zelltypen: es kommt nicht zu Abstoßungsreaktionen, da die verwendete Pigmentepithelzellen von Patienten selbst stammt; es handelt sich entwicklungsgeschichtlich um neuroepitheliale Zellen, die mit den
- 30 Zellen des Gehirns histogenetisch verwandt sind.



5

10

15

20

25

30



Glaskörper. Diese Ausführungsform der Erfindung ermöglicht beispielsweise einen direkten Zugang zum Papillenkopf und mit oder ohne genetische Modifikation neuroprotektive Mediatoren in oder in unmittelbarer Nähe der Papille freisetzen oder aktivieren.

5

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung von adenoviralen Vektoren großer DNA-Kapazität zur genetischen Modifikation von Pigmentepithelzellen in vivo. Wie in den Beispielen gezeigt, führt die in vivo Transduktion von RPE Zellen durch subretinale Injektion mit  
10 einem adenoviralen Vektor großer DNA-Kapazität zu einer überraschend stabilen Expression von mindestens 6 Monaten.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Arzneimittel oder Diagnostikum enthaltend eine erfindungsgemäße Pigmentepithelzelle sowie  
15 geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe. Geeignete Hilfs- und Zusatzstoffe, die beispielsweise der Stabilisierung oder Konservierung des Arzneimittels oder Diagnostikums dienen, sind dem Fachmann allgemein bekannt (siehe z. B. Sucker H et al. (1991) Pharmazeutische Technologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart). Beispiele für solche Hilfs- und/oder Zusatzstoffe sind physiologische  
20 Kochsalzlösungen, Ringer-Dextrose, Dextrose, Ringer-Laktat, entmineralisiertes Wasser, Stabilisatoren, Antioxidantien, Komplexbildner, antimikrobielle Verbindungen, Proteinaseinhibitoren und/oder inerte Gase.

25 Die folgende Figur und die Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie darauf zu beschränken.

#### BESCHREIBUNG DER FIGUR

30

Fig.1 Schematisierter Querschnitt durch das rechte Auge.



Das Irispigmentepithel befindet sich auf der Seite der Iris, die der Linse zugewandt ist. Die Makula ist der Bereich (ca. 6 mm Durchmesser), der die Fovea unmittelbar umgibt.

## 5 BEISPIELE

### 1. Isolierung der Zellsheets

Zur Isolierung der IPE-Zellen in Zellverbänden (Zellsheets) wurden Iridektomien  
10 frisch aus dem Operationssaal nach einer Trabekulektomie oder einer basalen  
Iridektomie abgeholt, in F12 Medium ((HAM) mit L-Glutamin, Gibco, Life  
Technologies, Paisely Scotland) gebracht und direkt weiterverarbeitet. Basale  
Iridektomien von Glaukompatienten oder Irisstücke von Ratten oder Schweinen  
wurden mit Accutase (Cat. No. L11-007, PAA Laboratories) in Dulbeccco's PBS  
15 mit 0,5 mmol/l EDTA x Na für 15-20 min behandelt. Das Gewebe, welches mit  
einer Iridektomie gewonnen werden kann, hat eine Fläche von ca. 3,5 mm<sup>2</sup> und  
enthält ca. 20000 IPE Zellen. Die Zellagen werden sehr behutsam mit F12  
Medium auf- und nieder pipettiert und auf Polystyrene ausplattiert. Es konnten die  
IPE Zellen vollständig als doppelte Zellage mit intakter Basalmembran unter der  
20 Stereolupe vom Stroma gelöst werden, was durch elektronenmikroskopische  
Untersuchung nachgewiesen werden konnte. Durch Inkubation mit 0.1 U/ml  
Chondroitinase ABC (Sigma) und 2.4 U/ml Heparinase (Sigma) in PBS bei pH  
7.4 für 2 Stunden bei 37 Grad Celsius konnte diese Basalmembran vollständig  
entfernt werden. Anschließend konnten die Zellsheets durch erneute 5 minütige  
25 Accutaseinkubation in Einzellzellen zerlegt werden.

Zur Isolierung der RPE-Zellen in Zellverbänden (Zellsheets) wurden in  
menschlichen Augen in der Peripherie nach lokaler Retinotomie autologe RPE  
Zellsheets und Einzelzellen mechanisch losgelöst und mit einer Kanüle abgesaugt.  
30 Lokal konnten 50.000 periphere RPE Zellen entnommen werden ohne dass die  
Patienten später über unangenehme gravierende Gesichtsfeldausfälle klagen. Die



Entnahme von je 50.000 RPE Zellen konnte an mehreren peripheren Stellen des Auges erfolgen.

5    **2. Vermehrung von IPE und RPE Zellen durch Kultivation auf Fibroblasten**

IPE oder RPE Zellen, die aus Iridektomien oder Augen von Organspendern gewonnen wurden, wurden auf Fibroblasten (3T3 Fibroblastenzelllinie der Maus), die als „feeder layer“ dienen, in F12 Medium kultiviert. Die Zellen werden  
10 innerhalb von einem Tag auf den Fibroblasten adhärent und beginnen zu proliferieren. Die Zahl der Zellen verdrei- bis vervierfachte sich auf den Fibroblasten innerhalb von 3 Tagen. Die Fibroblasten wurden zuvor mit 40 µg/ml Mitomycin C behandelt, so dass sie nach spätestens 10 Tagen absterben. Nach diesem Zeitpunkt erhält man eine Reinkultur an Pigmentepithelzellen.

15

**3. Injektion der IPE Zellen**

IPE Zellen wurden als Einzellellsuspension wie unter 1 beschrieben isoliert. Ein  
20 Tiermodell für die altersabhängige Makuladegeneration und für die retinale Degeneration, die durch einen spezifischen Phagozytosedefekt und Degeneration des RPE bedingt ist, ist die Royal College of Surgeons Rat (RCS Ratte). Dystrophen RCS Ratten (18 Tage alt) wurden in Ketanest/Nembutal Narkose die obere Bindehaut durch einen 4 mm langen Schnitt 4 mm hinter dem Limbus  
25 eröffnet. Dabei wurde die limbusnahe Bindehaut mit einer Kolibripinzette festgehalten.

**3.1. Subretinale Injektion**

Bei der subretinalen Injektion wurden mit einer 26 Gauge Kanüle Sklera,  
30 Aderhaut und retinales Pigmentepithel in Höhe des Äquators bis auf den Glaskörper durchstoßen. Eine Hamiltonspritze mit stumpfer 32 Gauge Kanüle



wurde 2-3 mm tangential zwischen Retina und RPE nach anterior eingeführt. Es wurden 60000 IPE Zellen in 0.5 µl Zellkulturmedium (F 12 (HAM) mit L-Glutamin, Gibco, Life Technologies, Paisely Scotland) injiziert. Nach Ablauf der Beobachtungszeit von 6 und 8 Monaten wurden die RCS Ratten getötet. Die Augen wurden enukleiert. Die Hornhäute wurden entfernt und die verbleibenden Teile der Augen wurden in 3 % Glutaraldehyd fixiert. Areale mit transplantierten Iriszellen konnten leicht an der Pigmentierung erkannt werden, wurden herausgeschnitten und für elektronenmikroskopischen Untersuchungen nach Routineprotokoll eingebettet. Ultrastrukturell waren überlebende, d.h. morphologisch intakte IPE Zellen im subretinalen Raum bis zu 8 Monaten nach Transplantation nachweisbar. Überlebende Photorezeptoren mit Innensegmenten aber ohne Außensegmente waren bis zu 6 Monaten nach subretinaler Transplantation vorhanden.

### 3.2 Injektion in den Glaskörper

Bei der Injektion in den Glaskörper erfolgte die Injektion an gleicher Stelle wie subretinal in 6 Augen. Allerdings wurde die Kanüle wie eine Kreisbogensekante 1-2 mm tief in den Glaskörper eingeführt. Die Injektion von 60000 IPE Zellen erfolgte in der Nähe der Papille. Im Beobachtungszeitraum von 2 Monaten blieb der Glaskörper und die Linse klar. Die IPE Zellen versammelten sich in allen 6 Augen makroskopisch oder funduskopisch sichtbar auf der Papille. Die Histologie zeigte, dass die IPE Zellen in den Papillenkopf einwanderten. Die Zellen waren stark pigmentiert und es gab keine Anzeichen von Zellschädigung oder Proliferation.

25

### 3.3. Injektion in die Aderhaut

Bei der Injektion in die Aderhaut wurde der gleiche Injektionsort wie subretinal gewählt. Die Sklera wurde mit einem spitzen Skalpell durch einen 1 mm langen Schnitt durchtrennt bis die Aderhaut sichtbar wurde. Die Kanüle wurde senkrecht zum Augapfel auf die Schnittstelle gestellt und 60000 IPE Zellen in 0.5 µl F12 Medium wurden in die Aderhaut injiziert. In die Aderhaut transplantierte IPE

30



5 Zellen führten in 15 Augen verglichen mit 6 unbehandelten Augen zu einem Überleben von Photorezeptoren bis zu 6 Monaten. Sowohl die Anzahl der überlebenden Photorezeptoren/ mm Retina ( $p=0.020$ ) als auch die maximale Kernhöhe ( $p=0.019$ ) waren im Mann-Whitney-Test signifikant unterschiedlich gegenüber den unbehandelten Augen (Tabelle 1).

	Anzahl der Photorezeptor Augen	Maximale Höhe der Kerne [ $\text{mm}^{-1}$ ] Photorezeptorzellkerne
<b><u>IPE-Transplantation</u></b>	15	
Median	12.3	1.0
25 <sup>th</sup> Percentile	0.0	0.0
75 <sup>th</sup> Percentile	45.5	3.0
<b><u>Kontrolle</u></b>	6	
<b><u>ohne Behandlung</u></b>		
Median	0.0	0.0
25 <sup>th</sup> Percentile	0.0	0.0
75 <sup>th</sup> Percentile	0.0	0.0
<b><u>Mann-Whitney-Test</u></b>		
P value	<u>0.020</u>	<u>0.019</u>

10 Tabelle 1: Median, 25 ste und 75 ste Percentile der Anzahl der noch vorhanden Photorezeptorzellkerne, der maximalen Dicke der Photorezeptorschicht in Semidünnschnitten 6 Monate nach Transplantation von IPE Zellen in die Aderhaut ist angegeben.



#### 4. Injektion der IPE Zellen der Ratte in das ZNS

Bei der stereotaktische Implantationsmethode wurden Wistar Ratten durch 1 ml/ 100 g Körpergewicht Avertin (2g Tribromethanol 3,3,3(trocken), 1 g Pentanol (flüssig), 8 ml 100% iger Ethanol und 90 ml Nacl 0,9%) in Form einer intraperitonealen Injektion narkotisiert. Der Schädel wurde präzise reproduzierbar an drei Knochenpunkten, den äußeren Gehörgängen und der Maxilla fixiert, so daß das Calvarium in Höhe des Bregmas waagerecht stand. Nach der medialen fronto-okzipitalen, 1,5 cm langen Hautinzision, wurde das Periost abgeschoben, um freie Sicht auf die Suturen der Schädelkalotte zu haben, die als Bezugspunkt für die stereotaktischen Koordinaten dienten. Die Koordinaten wurden anhand des Atlas von Praxinos und Watson (Praxinos G, Watson C. The rat brain in stereotactic coordinates. 1986;2 end Dr., Academic Press, Sydney) ermittelt:

Die Punktionsstelle war vom Bregma 1,5 mm nach frontal und 2mm nach rechts parietal. 4,5 mm in der Tiefe liegt der obere Anteil des Striatums. Das Bohrloch mit einem Durchmesser von etwa 0.5 mm wurde an der entsprechenden Position mit einem Präzisions-Wellenbohrer (Proxxon, Minimoto 40IE) unter Vermeidung einer Duraläsion angebracht. 5-10 µl der Zellsuspension wurden mit einer 25 µl N-702-N Hamilton-Spritze mit fixierter Nadel durch dieses Bohrloch in einer Injektionstiefe von 5 mm, ab der Duraoberfläche gemessen, eingebracht. Es wurden 60000 IPE Zellen von Long Evans Ratten in die Striata von je 4 Wistar Ratten injiziert. Bevor die Nadel herausgezogen wurde, wartete man 2 min, damit die Zellsuspension im Gewebe abdifferenzieren und der lokal entstandene Druck abgebaut werden konnte. Anderenfalls war zu befürchten, daß Zellen der zurückgezogenen Nadel in den Punktionskanal oder in die darüber liegenden Gewebeabschnitte folgen hätten können. Aus dem gleichen Grunde wartete man, nachdem man die Nadel 4 mm zurückgezogen hatte, nochmals 30 sec. bevor sie ganz entfernt wurde. Anschließend wurde eine Hautnaht angefertigt.

30

Nach 5 Wochen wurden die Gehirne mit 3 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer



perfusionsfixiert. Pigmentierte Areale aus den Striatum wurden herausgeschnitten und für die Elektronenmikroskopie eingebettet.

5 Makroskopisch konnten die transplantierten Areale leicht durch die  
Pigmentierung erkannt werden. Unter dem Elektronenmikroskop hatten die IPE  
Zellen intakte Mitochondrien und Plasmamembranen. Sie waren stark  
pigmentiert, enthielten Melanogenesestadien und bildeten Kontaktzonen mit  
Neuronen. Die IPE Zellen wurden stets einzeln ohne Kontakte zu anderen IPE  
10 Zellen angetroffen. Sie wurden auch 3-4 mm vom Stichkanal entfernt angetroffen,  
was eine aktive Wanderung der Zellen vermuten läßt. Die Neurone, die an die IPE  
Zellen angrenzten, waren morphologisch intakt. Immunkompetente Zellen  
(Makrophagen, Lymphozyten) wurden nicht beobachtet.

#### 5. Genetische Modifikation

15 Vereinzelte und adhärenzte Ratten- bzw. menschliche IPE-Zellen wurden in vitro  
mit 20, 50 und 100 MOI (multiplicity of infection) des adenoviralen Vektors mit  
grosser DNA Kapazität HC-Adenovirus „HC-AdFK7“, der das EGFP (enhanced  
green fluorescent protein) unter der Kontrolle des humanen CMV  
20 (cytomegalovirus)-Promotors als Transgen trägt, transduziert. Dazu wurden 80%  
konfluente Zellkulturen in F12 komplettem Medium mit der entsprechend  
verdünnten Virusstammlösung über 24 Stunden bei 37 ° C inkubiert. Das Medium  
wurde am nächsten Morgen gewechselt. Die Expression des Transgens wurde 24,  
48, 72 Stunden und dann jede weitere Woche unter einem Fluoreszenzmikroskop  
25 mit FITC-Filter als grüne Fluoreszenz innerhalb der Zellen überprüft.

Schon 24 Stunden nach der Transduktion war eine zarte Fluoreszenz sichtbar, die  
sich in den nächsten Tagen deutlich verstärkte. Die menschlichen IPE Zellen  
waren bei 100 MOI zu 100% transduziert, die Rattenzellen bei 20 MOI zu 80%  
30 und bei 50 und 100 MOI zu 100% transduziert. Eine Expression war bis zu einer  
Zeitspanne von 8 Wochen und länger in vitro nachweisbar.



In einem weiteren Experiment wurde der adenovirale Vektor großer DNA Kapazität AdhCMV.PEDF konstruiert. Dieser Vektor exprimiert die menschliche PEDF cDNA unter der Kontrolle des humanen CMV Promotors. Zusätzlich ist  
5 das PEDF Protein durch ein Poly-Histidin Epitop, das als Fusionsprotein mit dem PEDF exprimiert wird, markiert. Dieser Vektor wurde nach einem Standardverfahren (Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S (1998) Genomic DNA transfer with a high capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene  
10 expression and decreased toxicity. Nature Genetics 18: 180-183) in Cre-Rekombinase exprimierenden 293 Zellen produziert und durch CsCl Dichtegradienten Zentrifugation aufgereinigt.

Cytokeratin-positive humane IPE Zellen der 2. Passage wurden mit dem HC-  
15 Ad.CMV.PEDF Vektor transduziert. Dazu wurden 80% konfluente Zellkulturen in F12 komplettem Medium mit der entsprechend verdünnten Virusstammlösung über 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde am nächsten Morgen gewechselt. Die Expression des Transgens und die Sekretion des PEDF in den Kulturüberstand wurde nach 72 Stunden mit Hilfe spezifischer anti-Polyhistidin-  
20 Antikörper im ELISA überprüft. Die Kulturüberstände enthielten 150 ng PEDF/ml. Dies entspricht einer Produktion von 60 pg PEDF pro 1000 Zellen/72 Stunden. Durch Verwendung eines weiteren Antikörpers, der spezifisch das menschliche PEDF Protein erkennt, konnte in einem weiteren ELISA nachgewiesen werden, dass menschliche IPE Zellen im Gegensatz zu  
25 menschlichen RPE Zellen spontanerweise kein PEDF produzieren.

#### *IPE sheet Transfektion*

Neben Einzelzellen konnten auch Zellsheets transfiziert werden. Nach enzymatischer Entfernung der Basalmembranen waren IPE Zellsheets transfizierbar. Mit  
30 intakter Basalmembran waren die Zellsheets nicht transfizierbar, was mit PCR nachgewiesen wurde.



- Zur Transfektion von Zellsheets wurden Schweineaugen aus dem Schlachthof direkt nach der Schlachtung der Tiere in das Labor gebracht und weiterverarbeitet. Der Vorderabschnitt wurde ca. 2 mm hinter dem Limbus zirkulär abgetrennt. Von
- 5 posterior wurde dann die Iris stumpf abpräpariert und für 15 min bei 37 °C in 1 ml Accutase inkubiert. Mit einer im Feuer gebogenen Glaspipette wird dann das IPE vom Stroma der Iris gelöst. Eine Schätzung der Fläche der einzelnen erhaltenen IPE Zellsheets ergab zwischen 40.000 und 70.000 IPE Zellen pro Zellsheet.
- 10 Die IPE sheets wurden mit 200 MOI des EGFP-exprimierenden adenoviralen Vektors HC-AdFK7 über 24 h inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Die IPE sheets wurden in F12 kompl. Medium für 6 Tage zwischenkultiviert und auf EGFP Fluoreszenz hin untersucht, diese konnte jedoch aufgrund der Morphologie der Zellen mit sehr dicht konzentrierten
- 15 Melanin granula nicht sicher dargestellt werden. Daraufhin wurde mittels des QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) aus den Zellen DNA gewonnen. Die Angaben des Herstellers wurden befolgt. Mit den Primern prod1, der im Bereich des CMV Promotors und prod2, der im Bereich der Sequenz des EGFP an die DNA des HC-AdFK7 bindet, wurde mittels PCR das Transgen nachgewiesen. Prod1 und prod2
- 20 produzierten bei erfolgreich transduzierten Zellen ein PCR-Produkt von ca. 700 Basenpaaren Länge. Als Positivkontrolle diente ein Plasmid pFK7 mit dem gleichen insert wie es in HCAAdFK7 zu finden ist.

#### 6. Transplantation genetisch modifizierter Zellen subretinal

- 25 Mit dem HC-AdFK7 Vektor transduzierte IPE Zellen von Long Evans Ratten (albinotisch) wurden subretinal in 8 Augen von 8 Wistar Ratten transplantiert, nach der gleichen Methode wie für nicht transfizierte IPE Zellen beschrieben.
- 30 Vier Augen, in die IPE Zellen transplantiert worden waren, wurden nach 2 Monaten enukleiert, in Tissue Freezing Medium (Jung, Heidelberg, Germany)



eingeschlossen und bei -80 C eingefroren. Kryostatschnitte (7 µm) wurden nach dem Auftauen in Kaisers Glyceringelantine (Merck, Darmstadt, Germany) eingeschlossen und in einem Zeiss Axiophot Lichtmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 400-440 nm und einer Emissionswellenlänge von 470 nm mikroskopiert. Die subretinal transplantierten IPE Zellen zeigten eine deutliche Expression grün fluoreszierender Proteine.

Zur Auswertung mit dem Scanning Laser Ophthalmoscope (SLO) wurden die übrigen 4 transfizierten Ratten nach 14 Tagen bzw. 4 Monaten nach der Transfektion untersucht. Die Tiere wurden mit Ketanest narkotisiert und mit dem Scanning Laser Ophthalmoscope (Rodenstock, München) ausgewertet. Dabei wurde im Fluo-Modus mit dem Infrarotlaser (780 nm) und dem Argongrün- (514 nm) bzw. Argonblaulaser (488 nm) die Netzhaut der Ratten in Mydriasis gescannt. Das Gerät benutzt in diesem Modus einen zur Fluoreszenzbeobachtung des EGFP geeigneten Fluoreszeinsperrfilter. Die Bilder wurden auf S-VHS Video aufgenommen. Die analogen Videobilder wurden auf DV digital umkopiert, von repräsentativen Ausschnitten Bitmaps erstellt und mittels der Software Optimas 6.1 nach Fläche und Intensität ausgewertet.

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 4 Monaten blieb die Intensität der durch die transfizierten IPE Zellen verursachten Fluoreszenz sowie die Flächenausdehnung der transplantierten Areale im Fundus in allen 4 Augen konstant, d.h. die Expression der transfizierten Gene auf Proteinebene blieb unverändert.

#### 7. Subretinale Injektion von freiem Vektor zur genetischen Modifikation von RPE Zellen des Wirtes (in-vivo Gentherapie)

Zur subretinalen Injektion von freiem Vektor in vivo wurden verschiedene Konzentrationen eines HC-Adenovirus „HC-AdFK7“, der das EGFP (enhanced green fluorescent protein) Gen unter der Kontrolle eines CMV (cytomegalovirus)-



Promotors als Transgen trägt, in Wistar Ratten subretinal injiziert. Die Expression des Transgens wurde mit dem Scanning Laser Ophthalmoscope (Rodentstock, München) ausgewertet. Dabei wurde im Fluo-Modus mit dem Infrarotlaser (780 nm) und dem Argongrün- (514 nm) bzw. Argonblaulaser (488 nm) die Netzhaut der Ratten in Mydriasis gescannt. Das Gerät benutzt in diesem Modus einen zur Fluoreszenzbeobachtung des EGFP geeignetes Fluoreszeinsperrfilter. Die Bilder wurden auf S-VHS Video aufgenommen. Die analogen Videobilder wurden auf DV digital umkopiert, von repräsentativen Ausschnitten Bitmaps erstellt und mittels der Software Optimas 6.1 nach Fläche und Intensität ausgewertet.

10

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 6 Monaten blieb die Intensität der durch die transfizierten IPE Zellen verursachten Fluoreszenz sowie die Flächenausdehnung der transplantierten Areale im Fundus in allen 4 Augen konstant, d.h. die Expression der transfizierten Gene auf Proteinebene blieb unverändert. Nach 6 Monaten wurden die Tiere getötet, die Augen in 3 % Glutaraldehyd fixiert. Die Vorderabschnitte der Augen wurden entfernt und die verbleibenden hinteren Augenbecher wurden viergeteilt. Nachdem die Netzhäute entfernt wurden, wurden die Sklera, Aderhaut mit Pigmentepithel unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert Zeiss, Oberkochen, Germany) mit dem Anregungsfilter 450-490 nm und Emissionsfilter 520 nm (AF Analystechnik, Tübingen, Germany) untersucht. Dabei zeigte sich die typisch hexagonale Form transduzierter und EGFP positiver Pigmentepithelzellen.

20

#### 8. Transplantation genetisch modifizierter Zellen in das ZNS

25

Zur Transplantation genetisch modifizierter Zellen in das ZNS wurden mit dem HC-AdFK7 Vektor transduzierte und EGFP-exprimierende IPE Zellen (60000) aus Long Evans Ratten stereotaktisch wie oben beschrieben in das Striatum von je 4 Wistar Ratten injiziert.

30

Nach 8 Wochen wurden die Tiere durch Genickbruch in CO<sub>2</sub> Narkose getötet. Die



- Gehirne wurden herauspräpariert. Pigmentierte Areale mit transplantierten Zellen wurden aus dem Striatum herausgeschnitten und in Tissue Freezing Medium (Jung, Heidelber, Germany) eingefroren. Die Fluoreszenz, verursacht durch die Expression von EGFP der IPE Zellen, war in Gefrierschnitten 8 Wochen nach der
- 5 Transplantation in pigmentierten Zellen nachweisbar.

**9. Verhinderung der chorioidale Neovaskularisation genetisch modifiziert und PEDF exprimierende IPE Zellen in-vivo**

- 10 IPE Zellen wurden mit dem adenoviralem Vektor großer DNA Kapazität HC-AdFK7, der das EGFP (enhanced green fluorescent protein) Gen unter der Kontrolle eines CMV (Zytomegalovirus)-Promotors als Reportergen trägt, und gleichzeitig mit dem PEDF exprimierendem adenoviralem Vektor großer DNA-Kapazität HC-AdCMV.PEDF in vitro cotransfiziert und nach 6 Tagen in den
- 15 subretinalen Raum von Long Evans Ratten (60.000 Zellen/Auge) transplantiert (1. Versuchsgruppe). Die PEDF Expressionskassette im adenoviralen Vektor großer DNA Kapazität enthielt zusätzlich zur PEDF kodierenden Sequenz ein Poly-HIS-Epitop zum Nachweis des Proteins mittels eines Anti-HIS-Antikörpers. Eine Woche nach Injektion wurden die Ratten narkotisiert, die Pupillen wurden
- 20 dilatiert und die Ratten erhielten 3-4 Laserverbrennungen um den Nervus Opticus mit einem blau-grünen Argon-Laser (Coherent, Inc., Santa Clara, CA, USA). Die Energie des Lasers betrug 90 mW für 100 ms und der Strahldurchmesser war 100 µm. Eine zweite Gruppe von Ratten erhielt nur Laserverbrennungen ohne genetische Modifikation durch Zelltransplantation oder freie Vektoren. Nach 16
- 25 Tagen wurden die Ratten narkotisiert und erhielten 0,5 ml Liquemin i.p. (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland). Die Aorta ascendens wurde kanuliert und nach Eröffnung des rechten Vorhofes wurde das Blut mit 50 ml laktierter Ringerlösung (Stereofundin, Braun, Melsungen, Deutschland) ausgewaschen. Anschließend wurden 20 ml Ringerlösung mit 5mg/ml FITC-Dextran (Sigma Deisenhofen,
- 30 Deutschland) perfundiert. Die Augen wurden enukleiert, in Höhe des Limbus mit einem Scalpel angestochen und über Nacht in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Am



nächsten Tag wurde der Vorderabschnitt der Augen bis kurz hinter die Ora serrata durch einen umlaufenden Schnitt abgetrennt. Durch 4 radiale Schnitte wurde der verbleibende Augenbecher in Quadranten geteilt und die Netzhäute wurden entfernt. Quadranten, bestehend aus Pigmentepithel, Chorioidea und Sklera, die 5 Lasernarben enthielten, wurden 4 x 10 min in Tris-Puffer (TBS) und dann 10 min in 0,5 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,25 % Triton (Serva, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Nach zwei weiteren Spülungen wurden die Präparate mit 5 % BSA (Albumin, Bovine Fraktion Sigma, Deisenhofen, Deutschland) inkubiert. Ein Teil der Präparate wurde mit Antikörpern gegen 10 Histidin (Anti-His-Antibody, Qiagen, Hilden, Deutschland) inkubiert, um die Histidinreste im PEDF zu detektieren. Die primären Antikörper wurden mit anti-Maus IgG gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Rockland, Gilbertsville, PA, USA) sichtbar gemacht.

15 Ein anderer Teil der Präparate wurde mit anti-Maus CD 31 aus der Ratte (PECAM-1, Pharmingen, San Jose, CA, USA) behandelt, um die Endothelzellen sichtbar zu machen. Es folgte eine 2. Inkubation mit anti-Ratte IgG-Biotin (Amersham, Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) mit anschließender Lokalisation des Biotins durch Fluorolink Cy3 (Amersham Life 20 Sciences, Braunschweig, Deutschland). In einigen Aderhautpräparaten erfolgte eine Doppelmarkierung von PEDF und Endothelzellen. In diesen Fällen wurde PEDF Expression mit Cy3, wie beschrieben, und der PECAM-Biotin-Komplex mit Streptavidin- Alexa Fluor 350 (MoBiTec, Göttingen, Deutschland) sichtbar gemacht.

25 Die „Flatmount-Präparate“ wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet.

In Gruppe 1 war in 16 von 19 Lasernarben weder ein Austritt von FITC-Dextran 30 noch ein vermehrtes Auftreten von CD 31 positiven Zellen zu beobachten, wenn PEDF exprimierende IPE Zellen im Abstand von 100-1000  $\mu\text{m}$  von der Narbe



anwesend waren. Die Expression von PEDF durch die transplantierten IPE Zellen wurde mit anti -His Antikörpern nachgewiesen.

In der Kontrollgruppe 2 (nur Laserverbrennung) war in 9 von 12 Lasernarben  
5 Neovaskularisation vorhanden. Dies wurde erkannt am Austritt von Dextran-FITC in und um den Narbenbereich als auch durch das Vorhandensein von abgeflachten CD 31 positiven Endothelzellen in und um den Narbenbereich.

Damit wurde mit einer funktionellen (Dextran-Leakage) und einer immunologi-  
10 schen Methode (direkter Nachweis der neugebildeten Endothelzellen mit Antikörpern) die Neovaskularisation im gleichen Auge nachgewiesen. Diese „Flatmountpräparate“ erlauben die Beurteilung der gesamten Aderhaut. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Neovaskularisation durch Transplantation von IPE Zellen, die PEDF von einem adenoviralen Vektor großer DNA Kapazität  
15 exprimieren, inhibiert wird.



22. Februar 2001

Dr. med. Stefan Kochanek

K35245US BÖ/ATe/plö

Dr. rer. nat. Ulrich Schraemeyer

#### Patentansprüche

5

1. Pigmentepithelzelle des Auges, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle Vektor-DNA eines adenoviralen Vektors mit großer DNA-Kapazität enthält.
- 10 2. Pigmentepithelzelle des Auges nach Anspruch 1, wobei es sich um eine retinale Pigmentepithelzelle oder um eine Irispigmentepithelzelle handelt.
3. Pigmentepithelzelle des Auges nach Anspruch 1, wobei die Vektor-DNA mindestens eine therapeutische Nukleinsäure, insbesondere ein therapeu-  
15 tisches Gen, bevorzugt für einen neurotrophen Faktor wie GDNF, PEDF, NGF, BDNF, CNTF, bFGF oder Neurotrophin 3,4-5, einen anti-angiogenetischen Faktor wie einen löslichen VEGF-Rezeptor-1 (sflt-1), einen dominant-negativen VEGF-Rezeptor-2 (KDR) oder PEDF, einen anti-oxidativen Faktor wie Superoxiddismutase, Katalase oder verschiedene  
20 Peroxydasen, einen lysosomalen Faktor wie alpha-Mannosidase, beta-galactosidase, N-acetyl-beta-glucosaminidase, N-acetyl-beta-galactosaminidase sowie Lipase, oder einen gefäßerweiternden Faktor wie NO-Synthase, enthält.
- 25 4. Pigmentepithelzelle des Auges nach Anspruch 1, wobei die Vektor-DNA einen konstitutiv aktiven, regulierbaren und/oder einen gewebespezifischen Promotor und/oder ein regulierbares Expressionssystem enthält.



5. Pigmentepithelzelle des Auges nach Anspruch 1, wobei die Zelle mindestens ein therapeutisches Protein und/oder eine therapeutische RNA produziert.
6. Pigmentepithelzelle des Auges nach Anspruch 1, wobei die Zelle in einem festen Zellverband ist und/oder in Gegenwart eines „feeder layer“ und/oder in Serum-freiem Medium kultiviert worden ist.
7. Pigmentepithelzelle des Auges in Form eines festen Zellverbands.
8. Kultivierungssystem enthaltend mindestens eine Pigmentepithelzelle des Auges und einen „feeder layer“.
9. Verfahren zur Herstellung einer Pigmentepithelzelle des Auges gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle mit Hilfe eines adenoviralen Vektors mit großer DNA-Kapazität genetisch modifiziert wird.
10. Verfahren zur Herstellung einer Pigmentepithelzelle des Auges gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle in Serum-freiem Medium und/oder in Gegenwart eines „feeder layer“ kultiviert wird.
11. Verfahren zur Herstellung von Pigmentepithelzellen des Auges in Form eines festen Zellverbands gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Zellverband von umgebendem Gewebe, insbesondere enzymatisch, getrennt wird.
12. Verfahren zur Herstellung von Pigmentepithelzellen, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in einem Kultivierungssystem gemäß Anspruch 8 kultiviert werden.
13. Verwendung einer Pigmentepithelzelle gemäß Anspruch 1 zur Therapie einer Augenerkrankung, insbesondere von AMD, einem Glaukom, diabetischer



Retinopathie oder einer genetisch bedingten Erkrankung des Pigmentepithels.

14. Verwendung einer Pigmentepithelzelle gemäß Anspruch 7 zur Therapie einer Augenerkrankung, insbesondere von AMD, einem Glaukom, diabetischer Retinopathie oder einer genetisch bedingten Erkrankung des Pigmentepithels.
15. Verwendung einer Pigmentepithelzelle gemäß Anspruch 13 oder 14, wobei die Pigmentepithelzelle in das Auge, insbesondere die Aderhaut, in die Papille und/oder in den Glaskörper transplantiert wird.
16. Verwendung einer Pigmentepithelzelle zur Therapie einer Nervenerkrankung, insbesondere einer Erkrankung des Nervensystems, bevorzugt des ZNS, vor allem von Morbus Parkinson.
17. Verwendung einer Pigmentepithelzelle gemäß Anspruch 1 zur Therapie einer Nervenerkrankung, insbesondere einer Erkrankung des Nervensystems, bevorzugt des ZNS, vor allem von Morbus Parkinson.
18. Verwendung einer Pigmentepithelzelle gemäß Anspruch 16 oder 17, wobei die Pigmentepithelzelle in das Nervensystem, insbesondere das ZNS transplantiert wird.
19. Verwendung einer Pigmentepithelzelle gemäß Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Pigmentepithelzelle eine autologe Pigmentepithelzelle ist.
20. Verwendung einer Pigmentepithelzelle gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Pigmentepithelzelle eine autologe Pigmentepithelzelle ist.



21. Arzneimittel oder Diagnostikum enthaltend eine Pigmentepithelzelle des Auges gemäß Anspruch 1 sowie weitere Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.



[illegible]

5



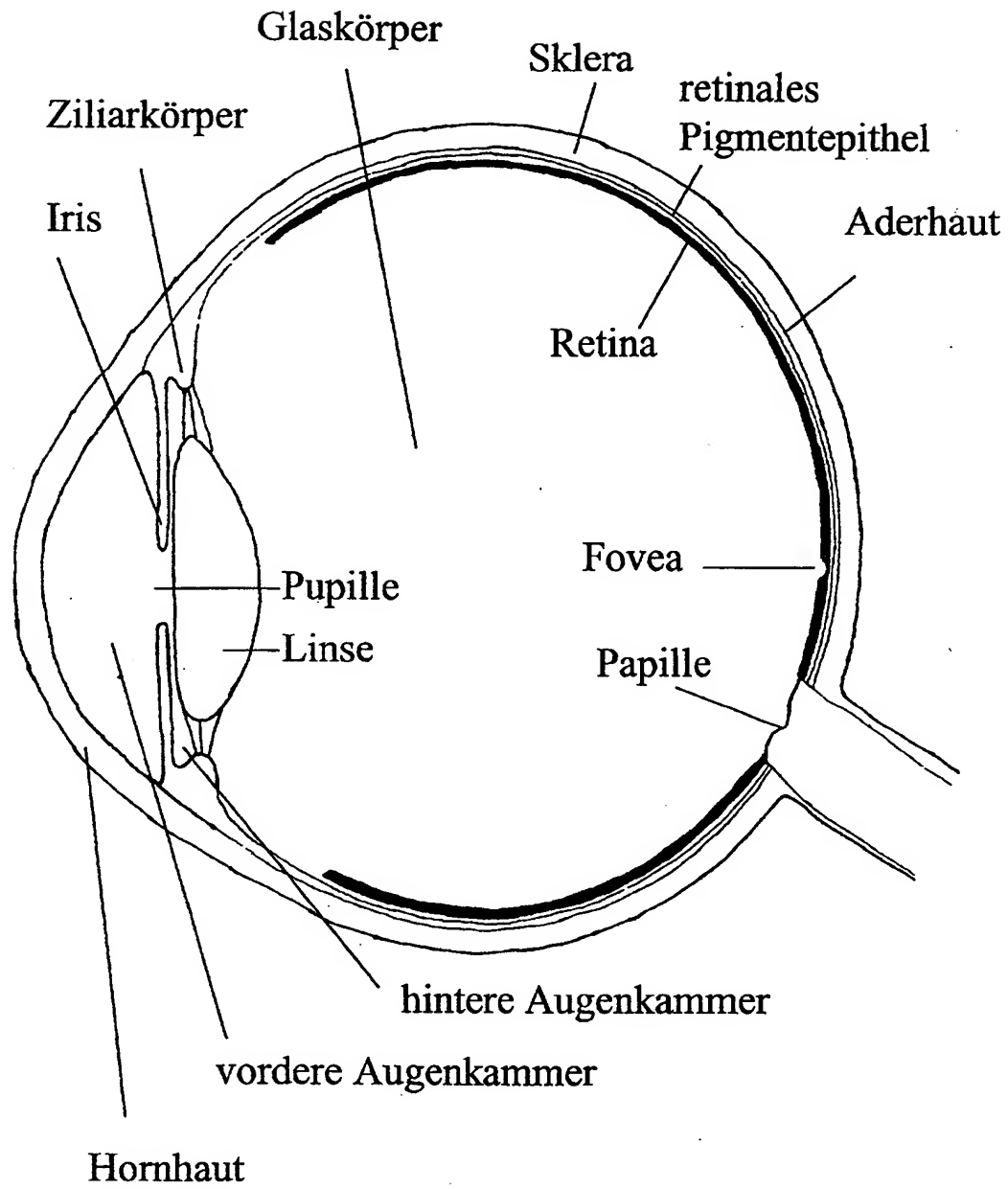


Fig. 1